

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-153946

(43)公開日 平成6年(1994)6月3日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/64	Z	9161-4B		
5/10				
15/57	Z N A	8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		9281-4B	5/ 00	B
審査請求 未請求 請求項の数 7 (全 10 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平4-312234	(71)出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成4年(1992)11月20日	(72)発明者	下村 猛 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	森本 裕紀 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	喜多村 直実 大阪府守口市八雲東町2-82-21-910
		(72)発明者	宮澤 恵二 兵庫県芦屋市高浜町3-1-524
		(74)代理人	弁理士 長谷川 曉司

(54)【発明の名称】 新規なタンパク質およびそれをコードする遺伝子

(57)【要約】

【構成】 1本鎖の肝実質細胞増殖因子(HGF)を活性型の2本鎖HGFに変換させる活性を持ったヒト血清由来のプロテアーゼの前駆体をコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 上記遺伝子を導入した形質転換体を培養して得られる培養液から該タンパク質を容易に、大量かつ安定して得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質。

【請求項2】 請求項1記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項3】 配列表の配列番号2に記載の塩基配列で表される核酸配列を部分配列として含有してなることを特徴とする請求項2記載の遺伝子。

【請求項4】 配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されることを特徴とする請求項2記載の遺伝子。

【請求項5】 プロモーターの下流に、請求項2記載の遺伝子を該遺伝子によってコードされるポリペプチドを発現するように組み込んだ発現ベクター。

【請求項6】 請求項5記載のベクターで宿主細胞を形質転換させて得られた形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を培養して配列長の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されるタンパク質を産生させる方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含む形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関し、詳細には肝実質細胞増殖因子（HGF）を特定の位置で切断して不活性の1本鎖型から活性を有する2本鎖型へ変換させるプロテアーゼ活性を有する新規なタンパク質の前駆体タンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子を含む形質転換体およびそれを用いたタンパク質の産生法に関する。

## 【 〇 〇 〇 二 】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 ヒト HGF の生理活性は、*in vitro* の実験において 1 本鎖型では見られず、2 本鎖型になった場合にのみ発現されることが確認されている。またヒト HGF を遺伝子組換えの手法を用いて生産する場合、無血清培養下では産生されるヒト HGF の大半は 1 本鎖型であることも確認されている。培養時における血清の添加の有無は製造コストに大きな影響を与えるものであることから、無血清培養下で HGF を生産する方法が望まれていた。

【0003】本発明者らの一部は先に、哺乳動物の血清中にかかる1本鎖型HGFを2本鎖型に変換するプロテ

したがって、主成分は、 $\alpha$ -D-グルコースと、 $\beta$ -D-グルコースの極少量が存在しないため、精製して純粋な標品を得るために多大な努力を要するという問題があった。また、

【 0 0 0 .4 】

【課題を解決するための手段】本発明者らの一部は、該プロテアーゼを前駆体としてヒト血しょうから精製し、この前駆体はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が約96,000ダルトンのタンパク質であることを見出した(特願平4-208034号)が、本発明者らは、当該タンパク質と同等の活性を有するタンパク質を容易に調製することを目的として鋭意検討を重ねた結果、かかる前駆体タンパク質をコードする遺伝子を初めて取得し、その結果遺伝子工学的手法を用いて該タンパク質を大量生産できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち本発明の要旨は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されることを特徴とするタンパク質、それをコードする遺伝子、該遺伝子がコードするポリペプチドを発現するベクター、形質転換体およびこれらを用いた当該タンパク質の産生法に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。

【０００６】本発明における新規タンパク質は、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するタンパク質であり、それがプロセッシングを受けた後に１本鎖型HGFを２本鎖型HGFに変換するという成熟型のプロテアーゼ活性を有するようになる範囲であれば、一部のアミノ酸を除去、置換、修飾または追加する等の改変を行ったものも本発明に含まれる。

【0007】上記タンパク質をコードする遺伝子としては、例えば配列表の配列番号2に記載の塩基配列で表される核酸配列を部分配列として含有してなるものや、配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるもの等が挙げられる。かかる遺伝子のDNA断片は、例えば以下のようにして得ることができ、本発明のタンパク質をコードするcDNAライブラリーとしては、市販のヒト肝臓から調整されたものが利用でき、このcDNAライブラリーから、ブローランドを富藤らの方法（ブローランド・グランド・オブ・ナショナル・ゲノム・サイエンス・コー・ユス・ロー〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8664-8668 (1986)〕により感染させ、培養する。培養後に形成されたコロニーを、部分DNA断片あるいは本発明のタンパク質の部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法（「ハイブリダイゼーション・テクノロジー」、コー・

[illegible]

分DNA断片が用いられる。具体的には、配列表の配列番号4に記載のDNA断片を+鎖DNAプライマー、配列表の配列番号5に記載のDNA断片を-鎖DNAプライマーとしてPCRを行い、得られた配列表の配列番号2に記載のDNA断片を作成してプローブとして用いる。また本発明タンパク質のアミノ酸配列より推定されるDNA配列に基づき合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いることもできる。

【0009】さらに上記のスクリーニング陽性のコロニーから、T. Maniatisらの方法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、85（1982））によりDNAを調製し、適当な制限酵素、例えばBamHI等で切断後、pUC18等のプラスミドにクローニングし、Sangerらのジデオキシ法（ブローディングス・オブ・ナショナル・アカデミーサイエンス・ユー・エス・エー「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」, 74, 5463（1977））によって目的とするDNA断片の塩基配列を決定することができる。

【0010】このようにして決定されるDNA断片の塩基配列（例えば、配列表の配列番号2に記載の塩基配列を部分配列として含むもの、配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるもの）は、配列表の配列番号1に示す本発明タンパク質をコードしている。また本発明のかかるDNA断片としては、それがプロセッシングを受けた後に1本鎖型HGFを2本鎖型HGFに変換するプロテアーゼ活性を有するようになる範囲であれば、一部の塩基を除去、置換、修飾または追加する等の改変を行ったものも含まれる。

【0011】上記のようにして得られるDNA断片は、その5'末端を修飾して常法に従って発現ベクターのプロモーターの下流に挿入され、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞宿主等の細胞内に導入される。次に本発明タンパク質の産生方法につき詳細に説明する。発現ベクターとしては、上記のようにして得られた本発明タンパク質をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが好適に使用される。例えば大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときには、発現ベクターはプロモーター、リボソーム結合(SD)配列、当該タンパク質遺伝子、転写終結配列およびプロモーターを制御する遺伝子よりなることが好ましい。

もしよしの

【0013】リボソーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでもよいが、16SリボソームRNAの3'末端領域の相補的な配列を4塩基以上連続して有するコンセンサス配列を持つ合成DNA配列でもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター、trpオペロンターミネーター等を有している方が好ましい。

【0014】さらにこれらの発現に必要な因子の発現プラスミド上での配列順序としては、5'上流側からプロモーター、SD配列、当該タンパク質遺伝子、転写終結因子の順に並ぶことが望ましい。また、発現ベクター上のSD配列と当該タンパク質遺伝子とのユニットを複数個同方向に挿入することにより、ベクター上の転写単位のコピー数を増加させる方法（特開平1-95798号公報）を用いることもできる。

【0015】発現ベクターとして使用できるものとしては、pUAI2（特開平1-95798号公報）、市販のpKK233-2（ファルマシア社製）等が挙げられる。また、融合蛋白として発現させる発現ベクターpGEXシリーズ（ファルマシア社製）等も同様に使用することができる。宿主細胞の形質転換法としては、常法に従い行うことができる。

【0016】形質転換体の培養は、モルキュラー・クローニング（コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー、1982年）に記載の方法に準じて行うことができる。上記したように、宿主細胞としては大腸菌、枯草菌、酵母等の微生物を使用することかできるか、本発明タンパク質が多くのシステイン残基を含み、そのシステイン残基間のチオール結合の位置およびタンパク質の高次構造が活性の維持に影響を与える可能性があることを考慮すると、動物細胞、例えばCHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞等を用いて当該タンパク質遺伝子を発現させることが望ましい。

【0017】動物細胞のプロモーターとしては種々のものが報告されているが、例えばSV40プロモーター、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター等を用いることができる。このプロモーターの下流に分泌シグナルおよび当該タンパク質遺伝子のDNA断片とを転写方向に従って挿入する。この場合、当該遺伝子のDNA断片を2-3bp短縮したものを挿入してよい。また当該遺伝

【図 18】下に当該タリハク遺像の正面図、その上流によりアブサル化部位が存在することを望ましい。例として、 $\text{A} = \text{A}^{\text{A}}$ 、 $\text{B} = \text{B}^{\text{B}}$ 、 $\text{C} = \text{C}^{\text{C}}$ 、 $\text{D} = \text{D}^{\text{D}}$ 、 $\text{E} = \text{E}^{\text{E}}$ 、 $\text{F} = \text{F}^{\text{F}}$ 、 $\text{G} = \text{G}^{\text{G}}$ 、 $\text{H} = \text{H}^{\text{H}}$ 、 $\text{I} = \text{I}^{\text{I}}$ 、 $\text{J} = \text{J}^{\text{J}}$ 、 $\text{K} = \text{K}^{\text{K}}$ 、 $\text{L} = \text{L}^{\text{L}}$ 、 $\text{M} = \text{M}^{\text{M}}$ 、 $\text{N} = \text{N}^{\text{N}}$ 、 $\text{O} = \text{O}^{\text{O}}$ 、 $\text{P} = \text{P}^{\text{P}}$ 、 $\text{Q} = \text{Q}^{\text{Q}}$ 、 $\text{R} = \text{R}^{\text{R}}$ 、 $\text{S} = \text{S}^{\text{S}}$ 、 $\text{T} = \text{T}^{\text{T}}$ 、 $\text{U} = \text{U}^{\text{U}}$ 、 $\text{V} = \text{V}^{\text{V}}$ 、 $\text{W} = \text{W}^{\text{W}}$ 、 $\text{X} = \text{X}^{\text{X}}$ 、 $\text{Y} = \text{Y}^{\text{Y}}$ 、 $\text{Z} = \text{Z}^{\text{Z}}$ 、 $\text{AA} = \text{AA}^{\text{AA}}$ 、 $\text{BB} = \text{BB}^{\text{BB}}$ 、 $\text{CC} = \text{CC}^{\text{CC}}$ 、 $\text{DD} = \text{DD}^{\text{DD}}$ 、 $\text{EE} = \text{EE}^{\text{EE}}$ 、 $\text{FF} = \text{FF}^{\text{FF}}$ 、 $\text{GG} = \text{GG}^{\text{GG}}$ 、 $\text{HH} = \text{HH}^{\text{HH}}$ 、 $\text{II} = \text{II}^{\text{II}}$ 、 $\text{JJ} = \text{JJ}^{\text{JJ}}$ 、 $\text{KK} = \text{KK}^{\text{KK}}$ 、 $\text{LL} = \text{LL}^{\text{LL}}$ 、 $\text{MM} = \text{MM}^{\text{MM}}$ 、 $\text{NN} = \text{NN}^{\text{NN}}$ 、 $\text{OO} = \text{OO}^{\text{OO}}$ 、 $\text{PP} = \text{PP}^{\text{PP}}$ 、 $\text{QQ} = \text{QQ}^{\text{QQ}}$ 、 $\text{RR} = \text{RR}^{\text{RR}}$ 、 $\text{SS} = \text{SS}^{\text{SS}}$ 、 $\text{TT} = \text{TT}^{\text{TT}}$ 、 $\text{UU} = \text{UU}^{\text{UU}}$ 、 $\text{VV} = \text{VV}^{\text{VV}}$ 、 $\text{WW} = \text{WW}^{\text{WW}}$ 、 $\text{XX} = \text{XX}^{\text{XX}}$ 、 $\text{YY} = \text{YY}^{\text{YY}}$ 、 $\text{ZZ} = \text{ZZ}^{\text{ZZ}}$ 、 $\text{AAA} = \text{AAA}^{\text{AAA}}$ 、 $\text{BBB} = \text{BBB}^{\text{BBB}}$ 、 $\text{CCC} = \text{CCC}^{\text{CCC}}$ 、 $\text{DDD} = \text{DDD}^{\text{DDD}}$ 、 $\text{EEE} = \text{EEE}^{\text{EEE}}$ 、 $\text{FFF} = \text{FFF}^{\text{FFF}}$ 、 $\text{GGG} = \text{GGG}^{\text{GGG}}$ 、 $\text{HHH} = \text{HHH}^{\text{HHH}}$ 、 $\text{III} = \text{III}^{\text{III}}$ 、 $\text{JJJ} = \text{JJJ}^{\text{JJJ}}$ 、 $\text{KKK} = \text{KKK}^{\text{KKK}}$ 、 $\text{LLL} = \text{LLL}^{\text{LLL}}$ 、 $\text{MMM} = \text{MMM}^{\text{MMM}}$ 、 $\text{NNN} = \text{NNN}^{\text{NNN}}$ 、 $\text{OOO} = \text{OOO}^{\text{OOO}}$ 、 $\text{PPP} = \text{PPP}^{\text{PPP}}$ 、 $\text{QQQ} = \text{QQQ}^{\text{QQQ}}$ 、 $\text{RRR} = \text{RRR}^{\text{RRR}}$ 、 $\text{SSS} = \text{SSS}^{\text{SSS}}$ 、 $\text{TTT} = \text{TTT}^{\text{TTT}}$ 、 $\text{UUU} = \text{UUU}^{\text{UUU}}$ 、 $\text{VVV} = \text{VVV}^{\text{VVV}}$ 、 $\text{WWW} = \text{WWW}^{\text{WWW}}$ 、 $\text{XXX} = \text{XXX}^{\text{XXX}}$ 、 $\text{YYY} = \text{YYY}^{\text{YYY}}$ 、 $\text{ZZZ} = \text{ZZZ}^{\text{ZZZ}}$ 、 $\text{AAAA} = \text{AAAA}^{\text{AAAA}}$ 、 $\text{BBBB} = \text{BBBB}^{\text{BBBB}}$ 、 $\text{CCCC} = \text{CCCC}^{\text{CCCC}}$ 、 $\text{DDDD} = \text{DDDD}^{\text{DDDD}}$ 、 $\text{EEEE} = \text{EEEE}^{\text{EEEE}}$ 、 $\text{FFFF} = \text{FFFF}^{\text{FFFF}}$ 、 $\text{GGGG} = \text{GGGG}^{\text{GGGG}}$ 、 $\text{HHHH} = \text{HHHH}^{\text{HHHH}}$ 、 $\text{IIII} = \text{IIII}^{\text{IIII}}$ 、 $\text{JJJJ} = \text{JJJJ}^{\text{JJJJ}}$ 、 $\text{KKKK} = \text{KKKK}^{\text{KKKK}}$ 、 $\text{LLLL} = \text{LLLL}^{\text{LLLL}}$ 、 $\text{MMMM} = \text{MMMM}^{\text{MMMM}}$ 、 $\text{NNNN} = \text{NNNN}^{\text{NNNN}}$ 、 $\text{OOOO} = \text{OOOO}^{\text{OOOO}}$ 、 $\text{PPPP} = \text{PPPP}^{\text{PPPP}}$ 、 $\text{QQQQ} = \text{QQQQ}^{\text{QQQQ}}$ 、 $\text{RRRR} = \text{RRRR}^{\text{RRRR}}$ 、 $\text{SSSS} = \text{SSSS}^{\text{SSSS}}$ 、 $\text{TTTT} = \text{TTTT}^{\text{TTTT}}$ 、 $\text{UUUU} = \text{UUUU}^{\text{UUUU}}$ 、 $\text{VVVV} = \text{VVVV}^{\text{VVVV}}$ 、 $\text{WWWW} = \text{WWWW}^{\text{WWWW}}$ 、 $\text{XXXX} = \text{XXXX}^{\text{XXXX}}$ 、 $\text{YYYY} = \text{YYYY}^{\text{YYYY}}$ 、 $\text{ZZZZ} = \text{ZZZZ}^{\text{ZZZZ}}$ 、 $\text{AAAAA} = \text{AAAAA}^{\text{AAAAA}}$ 、 $\text{BBBBB} = \text{BBBBB}^{\text{BBBBB}}$ 、 $\text{CCCCC} = \text{CCCCC}^{\text{CCCCC}}$ 、 $\text{DDDDD} = \text{DDDDD}^{\text{DDDDD}}$ 、 $\text{EEEEE} = \text{EEEEE}^{\text{EEEEE}}$ 、 $\text{FFFFFF} = \text{FFFFFF}^{\text{FFFFFF}}$ 、 $\text{GGGGG} = \text{GGGGG}^{\text{GGGGG}}$ 、 $\text{HHHHH} = \text{HHHHH}^{\text{HHHHH}}$ 、 $\text{IIIII} = \text{IIIII}^{\text{IIIII}}$ 、 $\text{JJJJJ} = \text{JJJJJ}^{\text{JJJJJ}}$ 、 $\text{KKKKK} = \text{KKKKK}^{\text{KKKKK}}$ 、 $\text{LLLLL} = \text{LLLLL}^{\text{LLLLL}}$ 、 $\text{MMMMM} = \text{MMMMM}^{\text{MMMMM}}$ 、 $\text{NNNNN} = \text{NNNNN}^{\text{NNNNN}}$ 、 $\text{OOOOO} = \text{OOOOO}^{\text{OOOOO}}$ 、 $\text{PPPPP} = \text{PPPPP}^{\text{PPPPP}}$ 、 $\text{QQQQQ} = \text{QQQQQ}^{\text{QQQQQ}}$ 、 $\text{RRRRR} = \text{RRRRR}^{\text{RRRRR}}$ 、 $\text{SSSSS} = \text{SSSSS}^{\text{SSSSS}}$ 、 $\text{TTTTT} = \text{TTTTT}^{\text{TTTTT}}$ 、 $\text{UUUUU} = \text{UUUUU}^{\text{UUUUU}}$ 、 $\text{VVVVV} = \text{VVVVV}^{\text{VVVVV}}$ 、 $\text{WWWWW} = \text{WWWWW}^{\text{WWWWW}}$ 、 $\text{XXXXX} = \text{XXXXX}^{\text{XXXXX}}$ 、 $\text{YYYYY} = \text{YYYYY}^{\text{YYYYY}}$ 、 $\text{ZZZZZ} = \text{ZZZZZ}^{\text{ZZZZZ}}$ 、 $\text{AAAAA} = \text{AAAAA}^{\text{AAAAA}}$ 、 $\text{BBBBB} = \text{BBBBB}^{\text{BBBBB}}$ 、 $\text{CCCCC} = \text{CCCCC}^{\text{CCCCC}}$ 、 $\text{DDDDD} = \text{DDDDD}^{\text{DDDDD}}$ 、 $\text{EEEEE} = \text{EEEEE}^{\text{EEEEE}}$ 、 $\text{FFFFFF} = \text{FFFFFF}^{\text{FFFFFF}}$ 、 $\text{GGGGG} = \text{GGGGG}^{\text{GGGGG}}$ 、 $\text{HHHHH} = \text{HHHHH}^{\text{HHHHH}}$ 、 $\text{IIIII} = \text{IIIII}^{\text{IIIII}}$ 、 $\text{JJJJJ} = \text{JJJJJ}^{\text{JJJJJ}}$ 、 $\text{KKKKK} = \text{KKKKK}^{\text{KKKKK}}$ 、 $\text{LLLLL} = \text{LLLLL}^{\text{LLLLL}}$ 、 $\text{MMMMM} = \text{MMMMM}^{\text{MMMMM}}$ 、 $\text{NNNNN} = \text{NNNNN}^{\text{NNNNN}}$ 、 $\text{OOOOO} = \text{OOOOO}^{\text{OOOOO}}$ 、 $\text{PPPPP} = \text{PPPPP}^{\text{PPPPP}}$ 、 $\text{QQQQQ} = \text{QQQQQ}^{\text{QQQQQ}}$ 、 $\text{RRRRR} = \text{RRRRR}^{\text{RRRRR}}$ 、 $\text{SSSSS} = \text{SSSSS}^{\text{SSSSS}}$ 、 $\text{TTTTT} = \text{TTTTT}^{\text{TTTTT}}$ 、 $\text{UUUUU} = \text{UUUUU}^{\text{UUUUU}}$ 、 $\text{VVVVV} = \text{VVVVV}^{\text{VVVVV}}$ 、 $\text{WWWWW} = \text{WWWWW}^{\text{WWWWW}}$ 、 $\text{XXXXX} = \text{XXXXX}^{\text{XXXXX}}$ 、 $\text{YYYYY} = \text{YYYYY}^{\text{YYYYY}}$ 、 $\text{ZZZZZ} = \text{ZZZZZ}^{\text{ZZZZZ}}$ 、 $\text{AAAAA} = \text{AAAAA}^{\text{AAAAA}}$ 、 $\text{BBBBB} = \text{BBBBB}^{\text{BBBBB}}$ 、 $\text{CCCCC} = \text{CCCCC}^{\text{CCCCC}}$ 、 $\text{DDDDD} = \text{DDDDD}^{\text{DDDDD}}$ 、 $\text{EEEEE} = \text{EEEEE}^{\text{EEEEE}}$ 、 $\text{FFFFFF} = \text{FFFFFF}^{\text{FFFFFF}}$ 、 $\text{GGGGG} = \text{GGGGG}^{\text{GGGGG}}$ 、 $\text{HHHHH} = \text{HHHHH}^{\text{HHHHH}}$ 、 $\text{IIIII} = \text{IIIII}^{\text{IIIII}}$ 、 $\text{JJJJJ} = \text{JJJJJ}^{\text{JJJJJ}}$ 、 $\text{KKKKK} = \text{KKKKK}^{\text{KKKKK}}$ 、 $\text{LLLLL} = \text{LLLLL}^{\text{LLLLL}}$ 、 $\text{MMMMM} =$

1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* were determined by the method of Arar and Collins (1971).

「 $\mathbf{P}$ 」と「 $\mathbf{Q}$ 」の間に「 $\rightarrow$ 」の論理関係が成り立つ。これを「 $\mathbf{P}$ ならば $\mathbf{Q}$ 」と表現する。このとき「 $\mathbf{P}$ 」を「 $\mathbf{P}$ ならば $\mathbf{Q}$ 」の前提、「 $\mathbf{Q}$ 」を「 $\mathbf{P}$ ならば $\mathbf{Q}$ 」の結論と呼ぶ。例として「 $\mathbf{P}$ 」が「 $\mathbf{A}$ ならば $\mathbf{B}$ 」で「 $\mathbf{Q}$ 」が「 $\mathbf{A}$ ならば $\mathbf{C}$ 」とすると「 $\mathbf{P}$ ならば $\mathbf{Q}$ 」は「 $\mathbf{A}$ ならば $\mathbf{B}$ ならば $\mathbf{C}$ 」となる。

[illegible]

1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* were determined by the method of Arar and Collins (1971).

質遺伝子にプロモーターを結合したDNA断片を2〜3個タンデムに挿入する方法を用いた場合には、当該タンパク質遺伝子それぞれの3'側にそれぞれポリアデニル化部位を存在させることが可能である。さらにSV40遺伝子、ウサギβ-グロブリン等の動物由来の遺伝子、化学的に合成されたエクソン、イントロンのスプライシングシグナル配列等を当該タンパク質遺伝子の上流または下流に挿入することも高発現のために有効な手段である。

【0019】上記の発現ベクターを用いて動物細胞、例えばCHO細胞を形質転換する際には、選択マーカーを用いることが望ましい。選択マーカー遺伝子を該発現ベクターのポリアデニル化部位下流に順方向あるいは逆方向に挿入しておく、形質転換体を得る際に、選択マーカー遺伝子を含む別のプラスミドを二重形質転換する必要がなくなる。このような選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子（ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー [J. Mol. Biol.]、159、601（1982））、抗生物質G-418耐性を与えるNeo遺伝子（ジャーナル オブ モレキュラー アプライド ジェネティクス [J. Mol. Appl. Genet.]、1、327（1982））、ミコフェノール酸耐性を与える大腸菌由来のEco gpI遺伝子（ブローディングス オブ ナショナル アカデミー サイエンス ユー エス エー [Proc. Natl. Acad. Sci. USA]、78、2072（1981））、抗生物質ハイグロマイシン耐性を与えるhph遺伝子（モレキュラー アンド セルラー バイオロジー [Mol. Cell. Biol.]、5、410（1985））等が挙げられる。

【0020】これらの各耐性遺伝子の5'上流側にはプロモーター、例えば前述のSV40由来のプロモーターが挿入されており、また各耐性遺伝子の3'下流側には、前述のポリアデニル化部位が含まれている。Invitrogen社から市販されている発現ベクターpCDNA/Neoは、選択マーカーとしてネオマイシンの耐性遺伝子を最初から有しており、このようなベクターを用いてもよい。発現ベクターに上記のような選択マーカー遺伝子が挿入されていない場合には、形質転換体の選択マーカーを有するベクター、例えばpSV2Neo（ジャーナル オブ モレキュラー アプライド ジェネティクス [J. Mol. Appl. Genet.]、1、327（1982））を用いることができる。

【0021】本発明の発現ベクターの構築は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78、2072（1981）に開示されている方法に従って行うことができる。

【0022】本発明の発現ベクターの構築は、Mol. Cell. Biol.、5、410（1985）に開示されている方法に従って行うことができる。

質遺伝子の発現ベクターと共に二重形質転換し、選択マーカー遺伝子の表現形質により形質転換体を容易に選択できる。

【0021】以上のような方法で、選択される当該タンパク質遺伝子を含む細胞について選択マーカーを変更して二重形質転換を繰り返すことは、発現量を上昇させることができるので好ましい。発現ベクターの動物細胞への導入は、リン酸カルシウム法（ビロロシー [Virology]、52、456（1973））、エレクトロポレーション法（ジャーナル オブ メンブレン バイオロジー [J. Membr. Biol.]、10、279（1972））等が挙げられる。

【0022】形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI 1640等を用い、5〜10%の血清存在下もしくは適当な成長因子の存在下、または無血清下にて培養する。当該タンパク質を産生している動物細胞は、その培養上清中に産生された当該タンパク質を分泌することから、この粗換え体の培養上清から当該タンパク質の分離精製を行うことが可能である。具体的には、生産された当該タンパク質を含む培養上清を各種クロマトグラフィー、例えば陰イオン交換樹脂、ヘパリン固定化樹脂、疎水クロマト用樹脂、アフィニティークロマト用樹脂等を適宜組み合わせたクロマトグラフィーにて精製することにより、当該タンパク質を単離精製することができる。

#### 【0023】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。

実施例1 本発明タンパク質の精製および部分アミノ酸配列の決定

特願平4-208034号の実施例2に記載の方法に従って、ヒト血しょうより、セリンプロテアーゼで処理することにより1本鎖型HGFを2本鎖型HGFに変換するプロテアーゼ活性を有し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて約96、000ダルトンの分子量を示すタンパク質を得た。この精製されたタンパク質を、緩衝液A（6M塩酸グアニジン、0.002Mエチレンジアミン4酢酸塩および1Mトリス塩酸バッファー（pH8.5））中で、2-メルカプトエタノールにより、40℃で2時間還元した後、等濃度のモノクローナル抗体を

【0024】本発明の発現ベクターの構築は、Mol. Cell. Biol.、5、410（1985）に開示されている方法に従って行うことができる。

【0025】本発明の発現ベクターの構築は、Mol. Cell. Biol.、5、410（1985）に開示されている方法に従って行うことができる。

7

(マイルス ラボラトリー社製) またはTLC-キモトリプシン (マイルス ラボラトリー社製) により酵素: 基質 = 1: 50で37℃、16時間反応させた。それを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に添加し、アセトニトリル/イソプロピルアルコール (3/7) 濃度0%から80%まで1時間の濃度勾配溶出を行い、複数のペプチド断片を得た。

【0025】これらのペプチド断片を真空乾燥した後、50%トリフルオロ酢酸60μlに溶解し、ポリブレン処理したグラスフィルターに添加し、Applied Biosystems社製\$470Aシーケンサーでエドマン分解し、アミノ酸配列を決定した。フェニルチオヒダントニン (PTH) アミノ酸の同定は、三菱化成社製のMC1 gel ODS 1HU (0.46×1.5cm) カラムを用い、酢酸緩衝液 (10mM酢酸緩衝液, pH4.7, 0.01% SDSおよび3.8%アセトニトリル) による単一溶媒溶出を流速1.2ml/分、温度43℃で行い、PTHアミノ酸の検出は269nmの吸光度で行った。これらのペプチドのうちの2つのペプチドのアミノ酸配列を、配列表の配列番号6および7に示す。

実施例2 PCR法による本発明タンパク質の部分DNA断片の調製

基質DNAは市販のヒト肝臓cDNAバンク (クイッククローン<sup>®</sup> ヒューマンリバー cDNA、クロンテック社製) を用いた。PCRは、パーキン エルマー シータス DNA サーマル サイ클ー (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) を使用して、ジーン アンプ キット (Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit、宝酒造製) を使って行った。基質DNA (1ng相当量)、10倍濃度の反応緩衝液 (500mMKCl、100mMトリス塩酸バッファー (pH8.3)、15mMMgCl<sub>2</sub> および0.1% (w/v) デシチン) 10μl およびそれぞれ10mMのdGTP、dATP、dCTP、dTTPを2μlずつ、プライマー#1として配列表の配列番号4に記載の5'鎖DNAプライマーおよびプライマー#2として配列表の配列番号5に記載の3'鎖DNAプライマーをそれぞれ1種類 (1配列) のプライマーが0.1μMになるようにして、Taq DNAポリメラーゼ0.5μlを加

8

(50mMトリス塩酸バッファー (pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、100mM塩化カリウムおよび1mMDTT) 2.5μl および制限酵素BglII 1μl (15ユニット) を加え、37℃で2時間反応させた後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、323bpのバンドを常法に従って切り出してDNAフラグメントを回収し、エタノール沈殿を行った。

【0026】このDNA断片をpUC19ベクターのBamHI部位に挿入した後、常法に従って塩基配列を決定した。決定したPCRフラグメントの塩基配列を、配列表の配列番号2に示す。

実施例3 本発明タンパク質をコードする完全長DNA断片を含むクローンのスクリーニング

上記実施例2で作製した323bpのPCR断片をモレキュラー クローニング (コールド スプリング ハーバー ラボラトリー、1982年) に記載の方法に従い、<sup>32</sup>P標識することによりスクリーニング用プローブとした。スクリーニング用のライブラリーとしては、ブリメイド ラムダ ファージ ライブラリー (ストラテジーン社製) 49才男性由来ヒト肝臓cDNAライブラリーを用いた。大腸菌はXL1-Blue (ストラテジーン社製) を用い、約500万ブランクとなるように上記のファージを感染させ、NZY培地で1晩生育させた後、デボン社製のジーン スクリーニング プラスにトランスファーさせた。そのメンブレンを0.1M水酸化ナトリウム-0.5M塩化ナトリウムが染み込んだる紙上に2分間静置し、続いて1.5M塩化ナトリウム-0.5Mトリス塩酸バッファー (pH7.5) が染み込んだる紙上で5分間静置した。このフィルターの処理を更に2回繰り返した後、2×SSC (2倍SSC) でフィルターを洗浄し、乾いたる紙上で風乾した。次にこのメンブレンに120mJ/cm<sup>2</sup>のUV照射を行うことにより、メンブレンに移したDNAの固定を行った。

【0027】こうして処理したメンブレン5枚を、50mMトリス塩酸バッファー (pH7.5)、1M塩化ナトリウムおよび1% SDSよりなる溶液50mlに浸漬し、65℃で2時間保持した。次に上記のP標識プローブ5ng/ml、鮭精子DNA100μg/ml、50mMトリス塩酸バッファー (pH7.5)、1M塩化ナトリウムおよび1% SDSよりなる溶液40mlに浸漬し、65℃で16時間保持した。その後メンブレンを取

り出し、0.5MNaClで室温5分間、0.1×SSCで室温5分間、0.5MNaClで室温5分間、0.1×SSCで室温5分間の洗浄を行った。最後に0.2×SSCで7分間の洗浄を行った。その後、0.1×SSCで室温5分間の洗浄を行った。得られた反応産物を放射線検出器で検出した。

【0028】本発明タンパク質の塩基配列を決定する試料は、ヒト肝臓cDNAバンク (クイッククローン<sup>®</sup> ヒューマンリバー cDNA、クロンテック社製) を用いた。

【0029】本発明タンパク質の塩基配列を決定する試料は、ヒト肝臓cDNAバンク (クイッククローン<sup>®</sup> ヒューマンリバー cDNA、クロンテック社製) を用いた。

【0030】本発明タンパク質の塩基配列を決定する試料は、ヒト肝臓cDNAバンク (クイッククローン<sup>®</sup> ヒューマンリバー cDNA、クロンテック社製) を用いた。

【0031】本発明タンパク質の塩基配列を決定する試料は、ヒト肝臓cDNAバンク (クイッククローン<sup>®</sup> ヒューマンリバー cDNA、クロンテック社製) を用いた。

5、100mM塩化ナトリウム、10mM硫酸マグネシウムおよび0.01%ゼラチン)と20 $\mu$ lのクロロホルムによりファージを抽出した。上記の200 $\mu$ lファージ抽出液と200 $\mu$ lXL1-Blueおよび1 $\mu$ lのR408ヘルパーファージを37℃、15分間処理した後、2 $\times$ YT培地5mlを加えて37℃で3時間振とう培養を行った。続いて70℃で20分間処理した後4000gで5分間遠心分離し、上清を得た。上清の100倍希釈液20 $\mu$ lをXL1-Blue 200 $\mu$ lと混ぜ、37℃で15分間処理した後、その内2 $\mu$ lをア

【0028】

【発明の効果】本発明により、1本鎖HGFを活性型の

配列

Met	Gly	Arg	Trp	Ala	Trp	Val	Pro	Ser	Pro	Trp	Pro	Pro	Gly	Leu
1				5					10				15	
Gly	Pro	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Gly
			20					25					30	
Phe	Gln	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Glu	Ser	Pro	Glu	Pro
			35				40					45		
Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Ala	Ile	Pro	Thr	Ile	Leu	Val	Thr	Ser	Val
			50				55					60		
Ser	Glu	Thr	Pro	Ala	Thr	Ser	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Pro	Gln
			65				70				75		80	
Gly	Gly	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro
			85					90					95	
Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Gly	Arg	Pro	Cys	Arg	Phe	Pro
			100					105					110	
Arg	Tyr	Gly	Gly	Arg	Met	Leu	His	Ala	Cys	Thr	Ser	Glu	Gly	Ser
			115				120					125		
His	Arg	Lys	Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	His	Asn	Tyr	Asp	Arg	Asp	Arg
			130				135					140		
Trp	Gly	Tyr	Cys	Val	Glu	Ala	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Gly	Pro	Ala
			145				150				155		160	
Leu	Asp	Pro	Cys	Ala	Ser	Gly	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys
			165					170					175	
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Glu	Tyr	Leu	Glu	Gly	Gly	Asp	Arg	Trp	Ala	Arg	Val	Arg	Gln	Gly
			210				215					220		
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Arg	Trp	Thr	Val	Val	Val	Val	Ser	Pro	Val	Val	Val	Val	Val	Val

2本鎖HGFに変換するプロテアーゼ活性を有するポリペプチドの前駆体タンパク質をコードする新規なDNA断片が得られ、その塩基配列が明らかにされた。その当該タンパク質遺伝子を挿入された発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、当該タンパク質を大量、安定、かつ容易に生産することが可能になり、当該タンパク質から成熟型のプロテアーゼが生産できると考えられる。

【0029】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 655

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

起源

生物名: ヒト

245 250 255  
 His Leu Ile Val Ala Thr Gly Thr Thr Val Cys Ala Cys Pro Pro Gly  
 260 265 270  
 Phe Ala Gly Arg Leu Cys Asn Ile Glu Pro Asp Glu Arg Cys Phe Leu  
 275 280 285  
 Gly Asn Gly Thr Gly Tyr Arg Gly Val Ala Ser Thr Ser Ala Ser Gly  
 290 295 300  
 Leu Ser Cys Leu Ala Trp Asn Ser Asp Leu Leu Tyr Gln Glu Leu His  
 305 310 315 320  
 Val Asp Ser Val Gly Ala Ala Ala Leu Leu Gly Leu Gly Pro His Ala  
 325 330 335  
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Glu Arg Pro Trp Cys Tyr Val Val  
 340 345 350  
 Lys Asp Ser Ala Leu Ser Trp Glu Tyr Cys Arg Leu Glu Ala Cys Glu  
 355 360 365  
 Ser Leu Thr Arg Val Gln Leu Ser Pro Asp Leu Leu Ala Thr Leu Pro  
 370 375 380  
 Glu Pro Ala Ser Pro Gly Arg Gln Ala Cys Gly Arg Arg His Lys Lys  
 385 390 395 400  
 Arg Thr Phe Leu Arg Pro Arg Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro  
 405 410 415  
 Gly Ser His Pro Trp Leu Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Asp Ser Phe Cys  
 420 425 430  
 Ala Gly Ser Leu Val His Thr Cys Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys  
 435 440 445  
 Phe Ser His Ser Pro Pro Arg Asp Ser Val Ser Val Val Leu Gly Gln  
 450 455 460  
 His Phe Phe Asn Arg Thr Thr Asp Val Thr Gln Thr Phe Gly Ile Glu  
 465 470 475 480  
 Lys Tyr Ile Pro Tyr Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His  
 485 490 495  
 Asp Leu Val Leu Ile Arg Leu Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr  
 500 505 510  
 Arg Ser Gln Phe Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr  
 515 520 525  
 Phe Pro Ala Gly His Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp  
 530 535 540  
 Glu Asn Val Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro  
 545 550 555 560  
 Leu Val Ala Asp His Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp  
 565 570 575  
 Val Cys Pro Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp  
 580 585 590  
 Val Ala Tyr Leu Tyr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg  
 610 615 620  
 Val Ile Thr Thr Val Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp  
 625 630 635  
 Ile Asn Asp Arg Cys Arg Leu Thr Arg Ala Leu Cys Val Val  
 640 645 650

11

12

645

650

655

【0030】配列番号：2

配列の長さ：329

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

直接の起源：Quick-clone™ ヒト肝臓cDNA (Clontech社製)

配列

```

GGATCC CAG ATT GCG GGC TGG GGC CAC TTG GAT GAG AAC GTG AGC GGC      48
      Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly
          1             5             10
TAC TCC AGC TCC CTG CGG GAG GCC CTG GTC CCC CTG GTC GCC GAC CAC      96
Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His
      15             20             25             30
AAG TGC AGC AGC CCT GAG GTC TAC GGC GCC GAC ATC AGC CCC AAC ATG     144
Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met
          35             40             45
CTC TGT GCC GGC TAC TTC GAC TGC AAG TCC GAC GCC TGC CAG GGG GAC     192
Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp
          50             55             60
TCA GGG GGG CCC CTG GCC TGC GAG AAG AAC GGC GTG GCT TAC CTC TAC     240
Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr
          65             70             75
GGC ATC ATC AGC TGG GGT GAC GGC TGC GGG CGG CTC CAC AAG CCG GGG     288
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys Pro Gly
          80             85             90
GTC TAC ACC CGC GTG GCC AAC TAT GTG GAC TGG AT GGATCC                 329
Val Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp
          95             100            105

```

【0031】配列番号：3

配列の長さ：2033

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

直接の起源：Pre-made Lambda phage Library、ヒト肝臓(49才、男) cDNA Library (Stratagene社製)

配列

```

ATGGGGGCGCT GGGCTGGGT CCCCAGCCCC TGGCCCCAC CGGGGCTGGG CCCCTTCCTC 60
CTCTCTCTCC TGCTGTGCT GCTGCTGCCA CCGGGGTTC AGCCCCAGCC TGGCGGGAAC 120
CGTACGGAGT CCCCAGAAC TAATGCCACA GCGACCCCTG CGATCCCCAC TATCCTGGTG 180
ACCTCTGTGA CCTCTGAGAC CCCAGCAACA AGTGCTCCAG AGGCAGAGGG ACCCCAAAGT 240
GGGGGGCTCC CGCCCCGCC CAGGGCAGTT CCCTCGAGCA GTAGCCCCCA GGCCCAAGCA 300
CTCACCAGAGG ACGGGAGGCC CTGCAGGTTT CCCTCCGCT ACGGGGGCCG CATGCTGCAT 360
GCTTGCACTT CGGAGGGCAG TGCACACAGG AAGTGGTGTG CCACAACCTA CAACTACGAC 420
CGGGACAGGG CCTGGGGCTA CTGTGTGGAG GCCACCCGCG CTCCAGGGGG CCCAGCTGCC 480
CGGGACAGGG CCGGGGGCTA CTGTGTGGAG GCCACCCGCG CTCCAGGGGG CCCAGCTGCC 540
CGACATACAG CTGTCTGAG CAGCCCTTGC CTGAACGGGG GCACCTGCCA CTGATCTGTG 780
GCCACCGGGA CCACCGGTG TGCCCTGCCA CCAGGCTTGC CTGGACGGCT CTGCAACATC 840
CGACATACAG CTGTCTGAG CAGCCCTTGC CTGAACGGGG GCACCTGCCA CTGATCTGTG 900

```



13

14

GTGGACTCCG TGGGCGCCGC GGCCCTGCTG GGCCTGGGCC CCCATGCCTA CTGCCGGAAT 1020  
 CCGGACAAATG ACGAGAGGCC CTGGTGCTAC GTGGTGAAGG ACAGCGCGCT CTCCTGGGAG 1080  
 TACTGCCGCC TGGAGGCCTG CGAATCCCTC ACCAGAGTCC AACTGTCACC GGATCTCCTG 1140  
 GCGACCTTGC CTGAGCCAGC CTCCCGGGG CGCCAGGCCT GCGGCAGGAG GCACAAGAAG 1200  
 AGGACGTTC TCGGCCACG TATCATCGGC GGCTCCTCCT CGCTGCCCGG CTCGCACCCC 1260  
 TGGCTGGCCG CCATCTACAT CGGGGACAGC TTCTGCGCCG GGAGCCTGGT CCACACCTGC 1320  
 TGGGTGGTGT CGGCCGCCA CTGCTTCTCC CACAGCCCCC CCAGGGACAG CGTCTCCGTG 1380  
 GTGCTGGGCC AGCACTTCTT CAACCGCACG ACGGACGTGA CGCAGACCTT CGGCATCGAG 1440  
 AAGTACATCC CGTACACCCT GTACTCGGTG TTCAACCCCA GCGACCACGA CCTCGTCCTG 1500  
 ATCCGGCTGA AGAAGAAAGG GGACCGCTGT GCCACACGCT CGCAGTTCGT GCAGCCCATC 1560  
 TGCCTGCCCG AGCCCGGCAG CACCTTCCCC GCAGGACACA AGTGCCAGAT TCGGGGCTGG 1620  
 GGCCACTTGG ATGAGAACGT GAGCGGCTAC TCCAGTCCC TCGGGAGGC CCTGGTCCCC 1680  
 CTGGTCGCCG ACCACAAGT CAGCAGCCCT GAGGTCTACG GCGCCGACAT CAGCCCCAAC 1740  
 ATGCTCTGTG CCGGCTACTT CGACTGCAAG TCCGACGCCT GCCAGGGGGA CTCAGGGGGG 1800  
 CCCTTGGCCT GCGAGAAGAA CGGCGTGGCT TACCTCTACG GCATCATCAG CTGGGGTGAC 1860  
 GGGTGGGGG GGCTCCACAA GCCGGGGGTC TACACCCGCG TGGCCAACIA TGTGGACTGG 1920  
 ATCAACGACC GGATACGGC TCCAGGCGG CTTGTGGCTC CCTCCTGACC CTCAGCGGG 1980  
 ACACCCCTGGT TCCCACCATT CCCTGCCCTG CTGACAATAA AGATATTTC AAG 2033

【0032】配列番号：4

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列

CTCGGATCCC ARATNGCNGG NTGGGG

26

R : G or A, N : A, G, C or T

【0033】配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列

CTCGGATCCA TCCARTCNAC RTARTT

26

R : G or A, N : A, G, C or T

【0034】配列番号：6

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間フラグメント

起源

生物名：ヒト

配列の長さ：8

10 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間フラグメント

起源

生物名：ヒト

配列

Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile

1

5

配列

Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// (C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)